

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-136548

(43)公開日 平成8年(1996)5月31日

(51)Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	P I	技術表示箇所
G 0 1 N	33/574	Z		
	33/493	A		
	33/573	A		

審査請求 未請求 請求項の数8 F D (全 6 頁)

(21)出願番号 特願平6-301616  
(22)出願日 平成6年(1994)11月11日

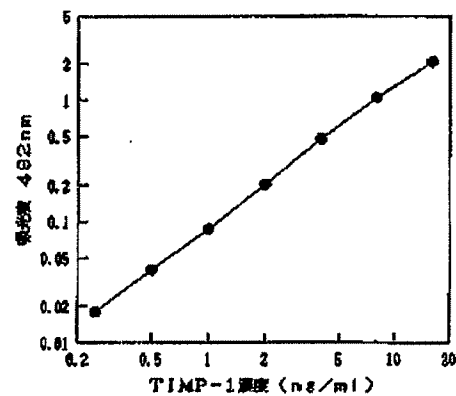
(71)出願人 000006116  
森永製菓株式会社  
東京都港区芝5丁目33番1号  
(72)発明者 黒田 和彦  
神奈川県横浜市港北区新吉田町2801-1朝  
日ハイム502  
(72)発明者 加藤 正俊  
神奈川県横浜市鶴見区東寺尾東台16-24  
(74)代理人 弁理士 川原田 一穂 (外1名)

(54)【発明の名称】 泌尿器癌の診断法

(57)【要約】

【目的】 泌尿器癌を容易に診断する方法を提供すること。

【構成】 尿中のティッシュ・インヒター・オブ・メタロプロテインナーゼ-1 (TIMP-1) を定量することを特徴とする泌尿器癌の診断法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 尿中のティッシュ・インヒター・オブ・メタロプロテイナーゼ-1 (TIMP-1) を定量することを特徴とする泌尿器癌の診断法。

【請求項2】 診断する癌が膀胱癌であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の泌尿器癌の診断法。

【請求項3】 診断する癌が尿管癌であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の泌尿器癌の診断法。

【請求項4】 診断する癌が腎臓癌であることを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の泌尿器癌の診断法。

【請求項5】 TIMP-1の定量をモノクローナル抗体を利用した免疫測定法により行うことを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の泌尿器癌の診断法。

【請求項6】 前記モノクローナル抗体の少なくとも一種が抗ヒトTIMP-1マウスモノクローナル抗体TIM-225である、請求項5記載の泌尿器癌の診断法。

【請求項7】 前記モノクローナル抗体の少なくとも一種が抗ヒトTIMP-1マウスモノクローナル抗体TIM-293である、請求項5記載の泌尿器癌の診断法。

【請求項8】 抗ヒトTIMP-1マウスモノクローナル抗体TIM-225及び抗ヒトTIMP-1マウスモノクローナル抗体TIM-293を用いた請求項5記載の泌尿器癌の診断法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、尿中のTIMP-1を定量することにより行う、簡便な泌尿器癌の診断方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 細胞外マトリックス（細胞間の結合組織）は、コラーゲン、プロテオグリカン、グリコサミングリカン、フィブロンectinやラミニン等のグリコプロテイン、エラスチンなどを主な構成成分とする複雑な構造を有している。細胞外マトリックスの代謝過程でタンパク質の分解に携わる主要な一群の酵素はマトリックス・メタロプロテイナーゼ(MMP) と総称される。これらのMMPは細胞から酵素前駆体として分泌され、細胞外マトリックスにおいて活性化されてタンパク質の分解作用を発揮する。これらMMPの酵素活性は、生体中の種々の賦活物質や阻害物質により調節されている[Matrisian (1990) Trends Genet. 6, 121-125; Murphy et al. (1991) Br. J. Rheumatol. 30, Suppl. 1, 25-31]。種々のMMPを包括的に阻害する生体物質はティッシュ・インヒター・オブ・メタロプロテイナーゼ (TIMP) の名で知られ、現在までに少なくともTIMP-1 [Ocherty et al. (1985) Nature 318, 66-69; Gasson et al. (1985) Nature 315, 768-771; Carmichael et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 2407-2411] および TIMP-2 [Boone et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 2800-2804; Stetler-Stevenson et al. (1990) J.

Biol. Chem. 265, 13933-13938]の2種類が知られている。TIMP-1は、184個のアミノ酸残基から成る分子量28.5kDの糖タンパク質であり、分子内に6個の-S-S-結合を有する。

【0003】 TIMP-1は活性型の間質コラーゲナーゼ、活性型ストロームライシン、あるいは92kDのIV型コラーゲナーゼなどと1:1の分子比で結合してこれらの酵素活性を阻害する [Welgus et al. (1983) J. Biol. Chem. 258, 12259-12264; Welgus et al. (1985) Collagen Relat. Res. 5, 167-179; Wilhelm et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 17213-17221]。関節リウマチ、歯根膜疾患、腫瘍の浸潤・転移などの種々の病変は活性型のMMPとそれらの阻害物質であるTIMP-1との間のバランスが崩れたときに起こるとされている [Emonard et al. (1990) Cell. Mol. Biol. 36, 131-153; Lennarz et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1071, 149-158; Murphy et al. (1991) Br. J. Rheumatol. 30, Suppl. 1, 25-31; Page (1991) J. Periodont. Res. 26, 230-242]。例えば、MMPの1つである間質コラーゲナーゼを生産する細胞は、同時にTIMP-1をも生産・分泌し、生体内での正確のコラーゲン分解活性は、活性型コラーゲナーゼのレベルとTIMP-1のレベルのバランスにより決まる [Stetler-Stevenson et al. (1990) J. Biol. Chem. 265, 13933-13938]。また、別のMMPであるIV型コラーゲン分解酵素が癌の転移と密接な関係のあること [Liotta et al. (1991) Cell 64, 327-336]や、ヒトの腫瘍細胞の浸潤性とTIMP-1レベルの間に逆の相関性のあること [Khokha et al. (1989) Science 243, 947-950] も知られており、癌とTIMP-1の間には深い関係があると考えられている。

【0004】 TIMP-1は、その遺伝子がX染色体上に位置し、健康人においても血清、脳脊髄液、羊水、涙液、唾液、尿などの体液中に普遍的に存在することが知られている。TIMP-1と癌との関連についてのこれまでの知見によれば、浸潤性の高い癌細胞が産生するTIMP-1のレベルが正常細胞あるいは浸潤性の低い癌細胞に比べて著しく低いことや、マウスのメラノーマ細胞による基底膜への浸潤と肺への転移がTIMP-1によって抑制されるなど、TIMP-1は癌の浸潤・転移と深い係わりのあることが示唆されている。膀胱癌とTIMP-1との関係については、膀胱癌患者の血清中のTIMP-1を測定した結果が報告されており、健康人の血清中濃度 $168.5 \pm 33.2$  ng/mlに対して膀胱癌患者の血清中濃度は $251.1 \pm 96.0$  ng/mlと統計上の有意差が認められるものの、その差は膀胱癌の診断に応用できるほど充分に大きな差とはいえず、実用化には到っていない。また、尿中のTIMP-1濃度と病態については未だ詳しい報告はなく、尿中のTIMP-1濃度を測定することにより泌尿器癌の診断を可能とした例はない。TIMP-1の定量方法としては、従来、生物活性を測定する方法 [Terato et al. (1976) Biochim. Biophys. Acta 445, 753]、酵素免疫測定法 [Clark et al. (1991) Matrix,

11, 76-85; Kodama et al. (1990) J. Immunol. Meth., 127, 193-198]等が報告されている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】膀胱癌、尿管癌、腎臓癌など泌尿器系の癌の診断は、従来主として、膀胱鏡などによる内視鏡検査、造影剤注入後のX線撮影などによる透視検査、バイオプシーによる病理組織検査などによって行われ、多検体を留便に検査する有効な方法がなかったために集団検診などによる早期発見が困難であった。本発明者らは、ヒト細胞（HeLa細胞）から得たTIMP-1に対する新たなモノクローナル抗体を応用した酵素免疫測定法により、健康人と泌尿器癌患者の尿中におけるTIMP-1の濃度の差が血清中におけるTIMP-1濃度の差と比べて顕著であることを見だし、これに基づき、尿中のTIMP-1を測定することにより被検者に苦痛を与えることなく泌尿器癌を容易に診断することを可能にする方法を見出した。

【0006】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明は、尿中のティッシュ・インヒビター・オブ・メタロプロテイナーゼ-1（TIMP-1）を定量することと特徴とする泌尿器癌の診断法に係わる。本発明によって診断することが可能な癌としては、特に、膀胱癌、尿管癌及び腎臓癌を挙げることが出来る。本発明方法は、特にモノクローナル抗体を利用した免疫測定法により行うことが好ましい。更に、該モノクローナル抗体の少なくとも一種が抗ヒトTIMP-1マウスモノクローナル抗体TIM-225（IgG）又はTIM-293（IgG）であることが好ましい。抗ヒトTIMP-1マウスモノクローナル抗体TIM-225及びTIM-293を産生するマウスハイブリドーマであるTIM-225-14及びTIM-293-21は、平成8年11月8日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所特許微生物寄託センターに寄託され、それぞれ、受託番号FERM P-14616及びFERM P-14615を付与されている。ヒトTIMP-1に対するマウスモノクローナル抗体の作製は例えば岩崎らの方法（単クローン抗体、講談社、1983年）に準じて行うことができる。また、TIMP-1の免疫測定法は、例えば石川の方法（超高度酵素免疫測定法、学会出版センター、1993年）を応用することにより実施することが出来る。

【0007】

【実施例】

実施例1 抗TIMP-1モノクローナル抗体の作製

（a）ヒトTIMP-1により免疫したマウス脾細胞の調製  
ヒト子宮頸部癌細胞株であるHeLa細胞の培養上清中よりCawston他（Cawston et al. (1981) Biochem. J., 195, 159-165）に準じて精製したTIMP-1をRibiアジュバント（Ribi Immunochem Research, Inc.社製）と混合し、NZBマウス（8週令）の腹腔内と皮下の2カ所

へ1匹当たり20 $\mu$ g注射し、免疫した。その後初回免疫と同様の方法で、3週間おきに2回追加免疫を行い、最終免疫の3日後に脾臓を摘出し、以下のようにして脾細胞をミエローマ細胞と融合させた。

【0008】（b）細胞融合

2X10<sup>6</sup>個のマウスミエローマ細胞株P3-X63-Ag8-U1(P3U1)と1X10<sup>6</sup>個の脾細胞を用いて、岩崎の方法（単クローン抗体、講談社、1983年）に従い、50%ポリエチレングリコール1500（ペーリンガー・マンハイム社製）の存在下に細胞融合を行った。融合後の細胞を、15%牛胎児血清（M. A. Bioproducts社製）を添加したERDF培地（橋本製薬株式会社製）に懸濁し、96ウェルプレート（Falcon社製）上で培養を行った。翌日、100 $\mu$ Mヒポキサンチン、0.4 $\mu$ Mアミノプテリン、16 $\mu$ Mチミジンおよび15%牛胎児血清を含むERDF培地（以下HAT培地という）を添加し、更に3日後にHAT培地を過剰した。1週間後HAT培地からアミノプテリンを除いた培地（以下HT培地という）に交換し、以後3～4日おきにHT培地の交換を行った。細胞融合から約2週間後、融合細胞の生育が肉眼的に確認された段階で、培養上清中の抗TIMP-1抗体価を以下に示す酵素免疫測定法により測定し、抗TIMP-1抗体を産生する細胞のスクリーニングを行った。

【0009】（c）酵素免疫測定法による抗TIMP-1抗体産生株のスクリーニング

イムノプレート（Maxisorp, Nunc社製）の各ウェルに、1 $\mu$ g/mlのTIMP-1溶液50 $\mu$ lを添加して4℃にて1晩コーティングし、リン酸緩衝化生理食塩水-0.05% Tween 20（以下PBS-Tweenという）にて1回洗浄後、0.1%血清アルブミンを含むPBS-Tweenによりブロッキング処理を行った。処理後のウェルに、上記bで得られたハイブリドーマの培養上清50 $\mu$ lを加えて37℃で1時間反応させた。PBS-Tweenにて洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体を加え、37℃にて1時間反応させた。洗浄後のウェルにペルオキシダーゼの基質溶液である0.3mg/ml 2,2'-アジノビス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸）ニアンモニウム塩-0.003%過酸化水素-0.1Mリン酸クエン酸緩衝液（pH 4.9）を100 $\mu$ l加え、30分間反応させた。100 $\mu$ lの1.5%シュウ酸溶液を加えて反応を停止後、415nmにおける吸光度をマイクロプレート光度計（MFR-4、東ソー株式会社製）にて測定した。

【0010】（d）抗TIMP-1抗体を産生するハイブリドーマのクローニング

上記（c）の酵素免疫測定法によるスクリーニングによって抗TIMP-1抗体の産生が確認されたウェル中の細胞を、次に限界希釈法によりクローニングした。即ち、96ウェルプレートの各ウェル当りに含まれる細胞数が3個、1個、0.3個になるように細胞を薄く、HT培地で培養した。10から14日後、細胞の生育が肉眼的に確認できるようになった段階で、培養上清中の抗TIMP-1抗体価を

上記(c)と同様にして酵素免疫測定法により測定した。抗TIMP-1抗体の産生が認められたウェル中の細胞についてクローニング操作を繰り返し行い、最終的に全てのウェルで抗TIMP-1抗体の産生が確認されるまでクローニングを繰り返した。このようにして、最終的に8株の抗TIMP-1モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株が得られた。

【0011】(e)抗TIMP-1モノクローナル抗体の生産  
上記8株のハイブリドーマによるモノクローナル抗体の生産は、各ハイブリドーマ株を牛胎児血清を添加したERDF培地等の適当な培地中で培養するか、もしくはハイブリドーマをヌードマウス腹腔中で培養したあと腹水を採取することにより行った。ERDF培地中の培養では、培養液中のモノクローナル抗体濃度は1~50 $\mu$ g/mlであった。一方、ヌードマウス腹腔中の培養では、予めブリストン(2,6,10,14-テトラメチルベンタデカン)を1匹当たり0.5ml腹腔内に投与し1~3週間後にハイブリドーマ5 $\times 10^5$ 個を腹腔内に投与した場合、細胞を投与後10~14日の腹水中の抗体濃度は1~10 $\mu$ g/mlであった。

【0012】(f)モノクローナル抗体の精製  
上記(e)により得られた培養上清もしくは腹水に含まれるモノクローナル抗体は、培養上清もしくは腹水を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で平衡化したプロテインA-セファロースCL-4Bカラムに流し、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄後、吸着したモノクローナル抗体を0.1Mグリシン-塩酸緩衝液(pH3.0)で溶出することにより精製した。

【0013】実施例2 モノクローナル抗体の同一化\*

表1 モノクローナル抗体の性質

モノクロー ナル抗体	TIMP-1阻害活性	反 応 性			
		イムノブロッティング		酵素免疫測定法 ( $A_{492}$ )	
		非還元	還元	ヒト TIMP-2	ウシ TIMP-1
TIM-33	有り	反応	反応	0.00	0.34
TIM-211	無し	反応	反応せず	0.00	0.29
TIM-216	有り	反応	反応せず	0.04	0.00
TIM-225	無し	反応	反応	0.00	0.00
TIM-280	無し	反応	反応せず	0.00	0.09
TIM-293	有り	反応	反応せず	0.00	0.00
TIM-347	無し	反応	反応せず	0.00	0.00
TIM-625	無し	反応	反応	0.00	0.00
Clark のモノクローナル抗体					
RRU-T1	無し	反応	反応せず	反応せず	-
RRU-T2	有り	反応	反応	反応せず	-

\*このようにして得られた8種類のモノクローナル抗体の性質を、以下に述べる方法により調べた。まず、それぞれのモノクローナル抗体によるTIMP-1活性の阻害を、 $^{14}$ C-コラーゲンをを用いたコラーゲナーゼ活性測定系(K.Terato et al. (1976) Biochim. Biophys. Acta, 445, 753-762)により調べた。次に、ヒトTIMP-1をメルカプトエタノールの存在下および非存在下において12%のポリアクリルアミドゲル上でSDS電気泳動し(U.K.Laemmli (1970) Nature, 227, 680-685)、ニトロセルロース膜に転写後それぞれのモノクローナル抗体を用いたイムノブロッティングを行い(日本生化学会編、純生化学実験講座2、タンパク質の化学(上)(1987) pp.41-57)、抗体の反応性を比較した。さらに、それぞれのモノクローナル抗体のヒトTIMP-2あるいはウシTIMP-1との交差反応性を、上記(c)と同様の酵素免疫測定法により調べた。1ウェル当たり40ngのヒトTIMP-2もしくはウシTIMP-1をコーティングしたイムノプレートを用い、得られたモノクローナル抗体を1次抗体として用いた。また、基質溶液として1mg/ml  $\alpha$ -ブフェニレンジアミン-0.012%過酸化水素-50mMリン酸クエン酸緩衝液(pH5.0)、反応停止液として1N硫酸溶液を用いた。測定は492nmの吸光度を測定した。これらの結果から、8種のモノクローナル抗体はそれぞれ表1のような特性を示した。

【0014】

【表1】

## 【0015】実施例3 -TIMP-1の定量-

## (a) モノクローナル抗体の組み合わせ

TIMP-1のサンドイッチ酵素免疫測定法を行うために、上記8種類のモノクローナル抗体の中から測定に最も適切な抗体の組合せを調べた。イムノプレートのウェルに、8種類の精製モノクローナル抗体をそれぞれ1  $\mu$ g/mlの濃度で別々にコートし、ブロッキング処理した後、精製TIMP-1を反応させた。つぎに熊谷、奥村（免疫実験操作法Ⅲ, pp.2425-2430, 1979年、日本免疫学会編）の方法によりビオチン化した各々のモノクローナル抗体（2次抗体）をペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（Vector社製）と共に加えて反応させた。洗浄後のウェルに基質溶液を加えて酵素反応を行い、415 nmの吸光度を測定した。この結果、8種類のモノクローナル抗体の中で、TIM-293のモノクローナル抗体を固定化抗体としてコーティングに用い、ビオチン化したTIM-225もしくはTIM-347のモノクローナル抗体を標識抗体（2次抗体）として用いる組合せが最も高感度な測定を可能とする組合せであった。

## 【0016】(b) モノクローナル抗体の酵素標識

TIM-225の抗体をImazawa らの方法（Imazawa et al. (1982) J. Appl. Biochem., 4, 41）によりペルオキシダーゼで標識を行った。

## 【0017】(c) モノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法

TIM-293を10  $\mu$ g/mlの濃度でイムノプレートにコーティングを行い、2次抗体として上記(b)のペルオキシダーゼ標識したTIM-225、基質溶液として1mg/ml o-フェニレンジアミン-0.012%酒酸化水素-50mMリン酸緩衝液(pH5.0)、反応停止液として1N硫酸溶液を用いて実施例1(c)と同様にして精製TIMP-1の測定を行った。測定は492nmの吸光度を測定した。この結果、従来法に比べて10倍高感度なTIMP-1の測定法が確立された(図1)。本測定法は、図1に示したように0.25ng/ml以上のTIMP-1を正確に定量することが可能である。本発明者らが高感度測定用に用いたTIMP-1に対するマウスモノクローナル抗体TIM-225およびTIM-293は、Clarkらが用いたマウスモノクローナル抗体とはTIMP-1阻害活性およびイムノプロットングでの反応性が異なることから、認識するエпитープが異なると考えられ、この違いが10倍の高感度を生み出したと考えられる。

## 【0018】(d) 尿中のTIMP-1の定量

(a)に記載した組合せのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチ酵素免疫測定法により、尿中のTIMP-1の定量を行った。この定量において、精製したTIMP-1を標準物質として用いた。健康人の尿中TIMP-1の濃度は、測定した6例中56 pg/mlを示す1例を除いて5例が0 pg/mlであり、平均値は9.33（標準偏差22.9）pg/mlである

(表2)のに対して、

## 【0019】

## 【表2】

表2. 健康人尿中のTIMP-1濃度

症例番号	TIMP-1濃度 (pg/ml)
A	0
B	0
C	56
D	0
E	0
F	0

【0020】同じく6例測定した膀胱癌患者の尿では、6例中3例が1000-5000 pg/ml という極めて高い値を、また、2例が500-1000 pg/ml の高値を示し、平均値は1535（標準偏差1737）pg/mlであった(表3)。

## 【0021】

## 【表3】

表3. 膀胱癌患者尿中のTIMP-1濃度

症例番号	TIMP-1濃度 (pg/ml)
1	997
2	1240
3	1467
4	4933
5	48
6	613

【0022】また、尿管癌患者の尿中TIMP-1濃度も、2例中1例が1500 pg/ml 以上の高値を示した(表4)。

## 【0023】

## 【表4】

表4. 尿管癌患者尿中のTIMP-1濃度

症例番号	TIMP-1濃度 (pg/ml)
7	54
8	1573

【0024】腎臓癌患者の尿においても、2例中1例が2200 pg/ml の高濃度を示した(表5)。

## 【0025】

## 【表5】

表5. 腎臓癌患者尿中のTIMP-1濃度

症例番号	TIMP-1濃度 (pg/ml)
------	------------------

9 0  
10 2200

【0026】上記のサンドイッチ酵素免疫測定法に供した癌患者および健康人の尿を用いてリバースサイモグラフィ法による分析を行ない、それぞれの尿中に含まれるTIMP-1量をバンドの濃さによって定性的に比較すると、サンドイッチ酵素免疫測定法の結果をよく反映する結果を示した。このことは、上記のサンドイッチ酵素免\*

\*疫測定法が確かに尿中のTIMP-1の濃度を測定するものであることを裏付けている。

【0027】

【発明の効果】本発明により、従来困難であった泌尿器癌の多検体測定が可能となり、集団検診などによる癌の早期発見に大きく貢献することが可能と考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は実施例3に記載したTIMP-1の測定法による結果を示すグラフである。

【図1】

